

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表 2000-507821

(P 2000-507821A)

(43) 公表日 平成12年6月27日 (2000.6.27)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ド' (参考)
A 2 3 K 1/16	3 0 1	A 2 3 K 1/16	3 0 1 A
A 6 1 P 43/00		A 6 1 K 31/00	6 4 3 Q
A 6 1 K 31/045		31/045	
31/122		31/12	6 0 2

審査請求 未請求 予備審査請求 有

(全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平9-534316
(86) (22) 出願日 平成9年3月21日 (1997.3.21)
(85) 翻訳文提出日 平成10年9月28日 (1998.9.28)
(86) 国際出願番号 PCT/SE97/00488
(87) 国際公開番号 W097/35491
(87) 国際公開日 平成9年10月2日 (1997.10.2)
(31) 優先権主張番号 9601197-8
(32) 優先日 平成8年3月27日 (1996.3.27)
(33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

(71) 出願人 アスタカロテヌ、アクチボラグ
スウェーデン国グスタブスベルグ、イドロ
ットスベージェン、4
(72) 発明者 オーケ、リンゲル
スウェーデン国バルムダー、クリップスシ
ゲン、5
(72) 発明者 ヨハン、インボール
スウェーデン国リドカーピング、ベックベ
ージェン、27
(74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 育種哺乳動物および生産哺乳動物の生産を増加させる因子

(57) 【要約】

少なくとも1種のキサントフィルから成る、育種哺乳動物および生産哺乳動物の生産を増加させる因子が記載される。好ましいキサントフィルはアスタキサンチンである。さらに、少なくとも1種のキサントフィル、好ましくはアスタキサンチン、から成る因子を飼料の中に含有させて育種哺乳動物および生産哺乳動物に投与することにより、育種哺乳動物および生産哺乳動物の生産を増加させる方法が開示される。さらに、少なくとも1種のキサントフィル、好ましくはアスタキサンチン、から成る因子を飼料の中に含有させて育種哺乳動物および生産哺乳動物に投与することによって前記哺乳動物の生産を増加させるための前記因子の使用が開示される。

【特許請求の範囲】

1. 少なくとも1種のキサントフィルから成ることを特徴とする、育種哺乳動物および生産哺乳動物の生産を増加させる因子。
2. キサントフィルの種類がアスタキサンチンである、請求項1に記載の因子。
3. アスタキサンチンが脂肪酸でエステル化された形態で存在する、請求項2に記載の因子。
4. アスタキサンチンが藻類ヘマトコッカス種の培養により生産されたものである、請求項3に記載の因子。
5. 少なくとも1種のキサントフィルから成る因子を飼料の中に含有させて育種哺乳動物および生産哺乳動物に投与することを特徴とする、育種哺乳動物および生産哺乳動物の生産を増加させる方法。
6. キサントフィルの種類がアスタキサンチンである、請求項5に記載の方法。
7. アスタキサンチンが脂肪酸でエステル化された形態で存在する、請求項6に記載の方法。
8. 投与される因子の量が飼料1kg当たり因子1～50mgの範囲である、請求項6または7に記載の方法。
9. 少なくとも1種のキサントフィルから成る因子を飼料の中に含有させて育種哺乳動物および生産哺乳動物に投与することによって前記哺乳動物の生産を増加させるための前記因子の使用。
10. キサントフィルの型がアスタキサンチンである、請求項9に記載の使用。
11. キサンチンが脂肪酸でエステル化された形態で存在する、請求項10に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

育種哺乳動物および生産哺乳動物の生産を増加させる因子

本発明は、育種哺乳動物および生産哺乳動物の生産を増加させる因子(agent)、前記因子を用いて生産を増加させる方法、および前記因子の使用、に関する。この因子は、少なくとも1種のキサントフィル、好ましくは天然産のアスタキサンチン(astaxanthin)、から成る。この因子は、育種動物および生産動物の生産を増加させるために、飼料の中に含有させて動物に投与される。

背景

食品、家畜類、育種動物および家畜の産業において、育種動物および生産動物の生産は経済的にきわめて重要である。それゆえ、例えば、生殖能の改良、生きて生まれた子孫の率の増加(特にブタ、雌牛およびヒツジ)、誕生後の低い死亡率、授乳期間の間の成長の増加、乳の生産量の増加、離乳と初めての発情との間の回復期間の短縮、および一般に免疫防御の強化による健康状態の改良、により、生産性を増加させる因子が要求されている。

本発明は、少なくとも1種のキサントフィル、好ましくは天然産のアスタキサンチン、から成る、このような因子、を提供するものである。

アスタキサンチンは、キサントフィルに属し、キサントフィルは、炭素および水素に加えて酸素を分子の中に含有するカロチノイドの大きいグループである。カロチノイドは、植物、真菌および細菌により新規に産生される。

キサントフィルは、卵を生む雌鶏の飼料において、そして世界のある地域におけるブロイラーの飼料において長い間使用されてきているが、育種哺乳動物または生産哺乳動物の飼料においては使用されてきていない。キサントフィルの目的は、消費者の要求を満たすために、産物、すなわち卵黄または脂肪および皮膚の

組織、を着色することであった。天然産のキサントフィルおよび合成されたキサントフィルの双方は、顔料源として使用されてきている(Hencken H.、1992、Poultry Science 71:711-717、Karunajeewa H. & A. Hoffman、1992、Arch für

G e f l u g e l k u n d e 56 (3) : 109-112)。

したがって、キサントフィル、およびそれらの中のアスタキサンチンが、育種哺乳動物および生産哺乳動物の生産を増加させる能力を有することは従来知られていない。

本発明に従いアスタキサンチンに富んだ飼料を使用するとき、生産性が改良される理由は知られていないが、それはアスタキサンチンの酸化防止性による、いわゆる遊離基を掃去する能力、のためであると仮定することができる。また、他のキサントフィルも酸化防止性を有する。しかしながら、生物学的試験において、アスタキサンチンが他のカロチノイドに比較して最良の酸化防止性を明らかに有することが示されている (M i k i W. , 1991, P u r e a n d A p p l C h e m 63 (1) : 141-146)。

発明の説明

したがって、本発明は、少なくとも1種のキサントフィルのから成る、育種哺乳動物および生産哺乳動物の生産を増加させる因子、を提供するものである。

育種哺乳動物および生産哺乳動物 (breeding and production mammals) の例は、ブタ、畜牛、ヒツジ、ウマ、イヌ、およびその他である。

好ましい態様において、キサントフィルの種類はアスタキサンチンである。特に好ましい態様において、アスタキサンチンは脂肪酸でエステル化された形態で存在する。アスタキサンチンの前記の形態は、藻類ヘマトコッカス種 (H a e m a t o c o c c u s s p.) の培養により生産されることができる。

本発明による因子は、異なる種類のキサントフィルの混合物、または同一キサントフィルの異なる形態の混合物、例えば、合成アスタキサンチンと天然産アスタキサンチンとの混合物、から成ることができる。

本発明は、さらに、少なくとも1種のキサントフィルから成る因子を飼料の中に含有させて育種哺乳動物および生産哺乳動物に投与する、育種哺乳動物および生産哺乳動物の生産を増加させる方法、を提供するものである。

前記の方法のある態様において、キサントフィルの種類は好ましくはアスタキサンチンである。本発明による前記方法の好ましい態様において、脂肪酸でエス

テル化された形態で存在するアスタキサンチンを投与する。投与する因子の量は、飼料1kg当たり因子1～50mgの範囲である。

さらに、本発明は、少なくとも1種のキサントフィルから成る因子を、飼料の中に含有させて育種哺乳動物および生産哺乳動物に投与することによって、前記哺乳動物の生産を増加させるための前記因子の使用、を包含する。

また、本発明のこの態様において、キサントフィルの好ましい種類はアスタキサンチンであり、このアスタキサンチンは特に好ましい態様において、脂肪酸でエステル化された形態で存在する。

実験および因子の製造の説明

実験において使用した因子は藻類により産生されたキサントフィルであるアスタキサンチンであり、そして使用した哺乳動物はブタであった。

他の源からのアスタキサンチン、およびさらに他のキサントフィルは、本発明の目的に対して同様に有効であることが期待される。しかしながら、藻類からのアスタキサンチンを使用する利点は、アスタキサンチンが脂肪酸でエステル化された形態で存在することであり (Renström B. et al.、1981、Phytochem 20 (11) : 2561-2564)、これによりこのエステル化されたアスタキサンチンは遊離のアスタキサンチンよりも取り扱いおよび貯蔵の間に安定である。

天然産のアスタキサンチンは、また、藻類に加えて、真菌および甲殻類から得ることもできる。本試験において使用するアスタキサンチンは、後述する方法において、藻類ヘマトコッカス種 (Haematococcus sp.) の培養により生産された。

ヘマトコッカス種 (Haematococcus sp.) は、オオヒゲマワリ (Volvocales) 目、コナミドリムシ (Chlamydomonadales) 科に属する単細胞の緑藻類である。生殖は通常無性細胞分裂により起こるが、同形配偶の性的生殖が散発的に起こる。この藻類をバッチ培養すると、それは鞭毛を装備するいわゆるマクロゾイド (macrozooids) の形態で生長する。培地の栄養含量が減少し、連続的生長を制限するようになると、

細胞は鞭毛を失い、パルメラ期に入り、その後いわゆるヘマトシスト (haematocysts) を形成する。それらは細胞を取り囲む強い細胞壁を特徴とし、細胞は脂肪の小胞に富み、この中にアスタキサンチンが蓄積される。ヘマトシストは藻類についての休止段階であり、これによりヘマトシストは乾燥およびその他の期間の間、生存することができる。

生産のために、急速に生長しかつ高い力価のアスタキサンチンを生産するヘマトコッカス (*Haematococcus* sp.) の種または株を適切に選択する。ヘマトコッカス (*Haematococcus*) の多数の異った種および株が、いわゆる菌株保存機関から入手可能であり、また、野生的に生長する集団から適当な株を単離することができる。適当な種はヘマトコッカス・プルビアリ (*H. pluvialis*) であり、これはNIVA (ノールウェー国) から入手可能である。

藻類の貯蔵培養物をそのために適当な培地中で純粋培養に保持する (表1を参照のこと)。温度はほぼ+25℃であり、そして光強度は約 $50 \mu \text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ であるべきである。

表1

ヘマトコッカス種 (*Haematococcus* sp.) の生長培地の組成

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	85 μM
KH_2PO_4	91 μM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	203 μM
NaHCO_3	189 μM
EDTA Na_2	7 μM
EDTA FeNa	6 μM
H_3BO_3	40 μM
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7 μM
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.8 μM
ビタミン B_{12}	10 $\mu\text{g} / \text{l}$
ビタミン B_1	10 $\mu\text{g} / \text{l}$

ビオチン	10 $\mu\text{g}/\text{l}$
NaNO_3	940 μM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	100 μM

生産培養の貯蔵培養物から、接種材料を取る。接種における細胞密度は >5000 細胞/ ml であり、そして細胞密度が約200,000細胞/ ml に到達したとき（これは約5日を要する）、培養物をより大きい体積に再接種する。藻類材料の培養においては、温度はほぼ $+25^\circ\text{C}$ に保持し、そして光強度は約 $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ であるべきである。同一の培地組成を貯蔵培養物について使用する。1~5%の CO_2 を含む圧縮空気で培養物を攪拌する。また、培地のpH値を6.5~8.5に保持するような量において、 CO_2 を別に添加することが

できる。

藻類培養物の体積がほぼ100リットルに到達したとき、それを生産ユニットの接種に使用する。この生産ユニットは、また、培養物の体積が $2 \sim 100 \text{ m}^3$ であることができるとき、藻類細胞を光に暴露することができる装置から成る。このような装置は、浅い皿(pond)、透過性の管構造、光源に向いたパネル、として設計することができ、あるいは、実例では、蛍光ランプの形態の沈められた照明具を装備したタンクとして設計することができる。

生産容器は、 >5000 細胞/ ml の細胞密度に接種され、そして表1に従い栄養塩を培地に添加する。温度はほぼ $+25^\circ\text{C}$ に保持し、そして光強度は $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ であるべきである。培養物を圧縮空気の助けにより攪拌する。pH値が6.5~8.5であるように、二酸化炭素を培養物に添加する。培地中の栄養がなくなり始めると、藻類細胞はパルメラ期へ代謝回転し、そしてアスタキサンチンを合成し始める。これに関連して、光強度を適当には約 $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ に増加させ、温度を $+30^\circ\text{C}$ に上げ、そして塩含量が0.1~0.3%となるように、 NaCl を培地に添加する。アスタキサンチンの生産を加速させるために、これらの変更を行う。10~20日で、細胞はヘマトシストを生じ、細胞密度が $5 \sim 10 \times 10^5$ 細胞/ ml に増加する。

細胞を沈降または遠心により培地から分離する。次いで、ペースト状の収集さ

れた藻類細胞をホモジナイザーに通過させて、細胞壁を破壊する。次いで、細胞壁が破壊された細胞から成るペーストを2つの別の方法において処理することができる。このペーストを乾燥させて、乾燥粉末を得る。アスタキサンチンが分解しないように、乾燥はできるだけおだやかに行うべきである。ペーストを乾燥させる別法はペーストから顔料を抽出することである。アスタキサンチンは高度に疎水性であるので、抽出は適当な油、例えば、大豆油、を使用して行うことができる。

飼料中のアスタキサンチンの量は、飼料1 kg 当たりアスタキサンチン1～50 mg の範囲であり、そして下記の実験において、飼料1 kg 当たりアスタキサンチン5 mg を使用した。

実験

出産前および授乳の間の21日の期間において、アスタキサンチンを加えるか、または加えない食餌を与えている離乳した子豚の成長速度に対する、雌ブタの食事にアスタキサンチンを加える効果、を研究するために、この実験を実施した。

材料および方法

実験の設計

天然アスタキサンチン（ヘマトコッカス・プルビ阿里ス（*Haematococcus pluvialis*））を加えた（5 mg / kg）、および加えない、商品化されている雌ブタ用の食餌を、妊娠した雌ブタに供給して、2つの実験的処置をした。

出産仔数 (parity) が2およびそれ以上の合計739頭の雌ブタを、出産仔数および年齢に基づいて2つの実験グループに分割した。分娩前の35日から、授乳の間、および離乳後21日まで、それぞれの実験飼料を雌ブタに与えた。

生まれた子豚および死産の子豚の数、および離乳前に死んだ子豚の数、を記録した。さらに、出産後第21日目における同腹仔の体重および離乳と再交尾との間の日数を記録した（表2）。これらの測定は、また、次のパリティの際にも実施した（表3）。

表2

雌ブタの能力に対する、雌ブタ飼料の天然アスタキサンチン（ヘマトコッカス・プルビアリス（*Haematococcus pluvialis*））の追加の効果

	処置		
	対照	アスタキサンチン 5mg/kg	有意性 (P=)
生まれた子豚の数	10.43	10.65	0.139
死産率	8.76	8.08	0.919
死産/同腹仔の数	0.90	0.70	0.479
日齢21の同腹仔 の体重、(kg)	49.50	52.60	0.001*

* この結果は統計学的に有意である ($P < 0.05$)。

表3

先行する授乳期間の間および離乳後21日に天然アスタキサンチン（ヘマトコッカス・プルビアリス（*Haematococcus pluvialis*））を投与された雌ブタの能力

出産仔数	アスタキサンチン	FR (%)	WRMI (日)	B. A.	S. B. P. (%)
2	—	93	10.30	10.7	7.4
	+	85	7.40	10.9	7.5
3	—	86	10.00	11.0	5.8
	+	83	8.20	9.4	6.1
4	—	81	11.0	10.3	11.1
	+	80	7.30	10.4	9.4
5	—	77	9.20	10.5	14.0
	+	73	7.70	9.8	14.0
有意性					
アスタキサンチン (A)		0.211	0.004*	0.461	0.786
パリティ (P)		0.045*	0.366	0.119	0.001*
A * P		0.927	0.740	0.769	0.906

* この結果は統計学的に有意である ($P < 0.05$)。

FR = 分娩速度

WRMI = 離乳と再交尾との間の間隔

BA = 生きて生まれたブタの数

SBP = 死産率

上記に示す結果から、天然に産生されたアスタキサンチンは雌ブタの能力を改良する、と結論することができる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE 97/00488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: A23K 1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: A23K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, CLAIMS/US PATENTS, JAPIO, EPODOC, CAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SE 503336 C2 (ASTA CAROTENE AB ET AL), 20 March 1996 (20.03.96), claims 1-11 -----	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

24 June 1997

10.07.97

Name and mailing address of the ISA/
Swedish Patent Office
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Sofia Nikolopoulou
Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

03/06/97

International application No.

PCT/SE 97/00488

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
SE 503336 C2	20/03/96	FI 971083 D	00/00/00
		NO 971051 A	07/03/97
		SE 9403147 A	20/03/96
		WO 9608977 A	28/03/96
<hr/>			

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, S D, SZ, UG), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, L R, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN

THIS PAGE BLANK (USPTO)